

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 770 217
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②1 N° d'enregistrement national : 97 13384

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 K 14/47, C 07 K 16/18, C 12 N 15/12, 5/10, 15/
85, G 01 N 33/68, A 61 K 48/00, 38/17

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

②2 Date de dépôt : 24.10.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.04.99 Bulletin 99/17.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE POULENC RORER SA
SOCIETE ANONYME — FR.

⑦2 Inventeur(s) : CZECH CHRISTIAN, MERCKEN LUC
et PRADIER LAURENT.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) :

⑤4 PEPTIDES CAPABLES D'INHIBER L'INTERACTION ENTRE LES PRESENILINES ET LE PRECURSEUR DU
PEPTIDE B-AMYOÏDE ET/OU LE PEPTIDE B-AMYOÏDE.

⑤7 — La présente invention concerne de nouvelles séquen-
ces peptidiques et nucléotidiques, et leur utilisation pharma-
ceutique. Plus particulièrement, la présente invention
concerne de nouveaux polypeptides capables d'inhiber au
moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la pré-
séniline 2 d'une part et le précurseur du peptide β -amyloïde
et/ ou le peptide (β -amyloïde d'autre part.

FR 2 770 217 - A1



La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et nucléotidiques. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 d'une part et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde d'autre part.

Le peptide amyloïde A β , de 37 à 42 acides aminés, est le principal composant protéique des plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Ce peptide est produit par clivage de son précurseur, la protéine précurseur de peptide amyloïde (APP). Des mutations dans le gène de l'APP sont responsables de certaines formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer. Cependant la majorité de ces formes sont liées à la présence de mutations sur deux gènes, présénilines PS1 (initialement nommé S182) et PS2 (initialement STM2), récemment identifiés par clonage positionnel (Hardy, 1997). Ces formes sont dominantes et ces anomalies correspondent toutes à des mutations faux-sens à l'exception d'une entraînant la délétion d'un exon. Les présénilines sont des protéines hydrophobes membranaires d'environ 45-50 kDa de masse moléculaire et qui présentent 67% d'identité entre elles. Elles sont homologues à deux protéines de *C. elegans*, SPE4 et Sel-12, qui sont impliquées de façon indirecte respectivement dans le transport intracellulaire et dans la signalisation des récepteurs Notch. Cependant, la fonction physiologique des présénilines est encore inconnue. L'implication dans la maladie d'Alzheimer, de deux protéines si voisines, laisse à penser que les présénilines contribuent à une voie physiologique essentielle dans l'étiologie de cette pathologie.

La protéine PS1 comprend 467 acides aminés et PS2 448. Toutes deux présentent la structure d'une protéine membranaire avec de 6 à 8 domaines transmembranaires potentiels. Chacune des présénilines est sujette in vivo à un clivage protéolytique précis résultant en deux fragments généralement dénommés fragments N(amino)- et C(carboxy)-terminaux (Thinakaran et col., 1996). Ce clivage a été cartographié entre les résidus 291 et 299 de PS1 (Podlisny et col., 1997) et dans

une région homologue de PS2. On entend donc en général par fragment N-terminal (N-ter), le fragment de la position 1 à approximativement 291 de PS1 et par fragment C-terminal, le complément. Bien que la topologie exacte des présénilines dans les membranes lipidiques ne soit pas clairement établie, il est proposé que leurs
5 extrémités N- et C-terminales, ainsi que la grande boucle hydrophile, soient présentes dans le compartiment cytosolique (Doan et col, 1996, voir schéma figure 1).

Il a maintenant été démontré que les formes mutées des présénilines induisent l'augmentation de la production du peptide amyloïde long A β 1-42 par rapport à celle de A β 1-40 autant chez les patients porteurs (Scheuner et coll., 1996),
10 qu'en cellules transfectées (Borchelt et coll., 1996) ou en souris transgéniques (Duff et coll; 1996). Le peptide amyloïde A β , qui forme les plaques séniles, lésions caractéristiques de la pathologie, et ses différentes formes sont dérivés du catabolisme de la protéine précurseur de l'amyloïde, APP. En particulier, deux formes essentielles du peptide amyloïde ont été décrites, une de quarante résidus, A β 40, et l'autre
15 possédant deux résidus supplémentaires en son carboxy terminal, A β 42. In vitro, le peptide A β présente de fortes propriétés d'agrégation qui sont accrues pour la forme A β 42 et ce dernier semble effectivement former les premiers agrégats détectables dans la pathologie. Par ailleurs, la forme A β 42 est spécifiquement produite après trauma crânien chez l'homme, lequel constitue un des facteurs de risques
20 environnementaux les mieux établis de la maladie d'Alzheimer. De plus, les formes génétiques précoces de la maladie liées à des mutations autant sur l'APP (il y en a six) que maintenant sur les présénilines 1 et 2, concourent toutes à une augmentation du ratio A β 42/A β 40. L'ensemble de ces facteurs semble désigner le A β 42 comme l'agent clé de la pathologie autant dans les formes génétiques que sporadiques de la
25 maladie et l'élucidation de son mécanisme de formation est devenu une question fondamentale.

A cet égard, la formation de complexe entre le précurseur du peptide β -amyloïde et PS1 ou PS2 a été rapportée (Weidemann et al. 1997, Xia et al., 1997) cependant on ne connaît pas la nature précise des événements responsables de la

production du peptide β -amyloïde et aucun lien n'a encore pu être établi entre le rôle possible de ces complexes et la production du peptide β -amyloïde A β 42. Il est néanmoins important de remarquer que le peptide A β 42, mais non pas le A β 40, semble être localisé dans le reticulum endoplasmique dans les cellules neuronales

5 (Hartmann et al., 1997).

La présente invention résulte de l'identification et de la caractérisation par la demanderesse de régions particulières de la préséniline 1 (PS1) et de la préséniline 2 (PS2), ainsi que de régions particulières du précurseur du peptide β -amyloïde (APP) impliquées dans la formation de complexes APP/PS1 et APP/PS2.

10 La présente invention découle en particulier de la mise en évidence de la capacité de la région N-terminale hydrophile (acides aminés 1-87) de la PS2 à reconnaître différents domaines de APP. Elle découle en outre de la mise en évidence de propriétés similaires pour la région N-terminale de PS1 (fragment 1-213). Elle résulte également de la démonstration de la capacité des polypeptides dérivés des

15 régions des présénilines définies ci-avant à inhiber la formation des complexes entre l'APP et les présénilines.

La présente invention résulte en outre de la mise en évidence de la localisation cellulaire particulière de ces interactions. Elle découle plus particulièrement du fait que ces interactions peuvent prendre place non seulement au

20 niveau membranaire mais également au niveau de la lumière du reticulum endoplasmique et dans le compartiment extracellulaire.

La caractérisation des domaines d'interaction de APP et des présénilines et la mise en évidence des différentes localisations cellulaires de ces interactions permettent d'envisager la préparation de nouveau polypeptides utilisables

25 pharmaceutiquement.

Un premier objet de l'invention concerne donc des polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

Selon un mode particulier, les polypeptides selon l'invention comportent au moins une partie de la préséniline 2 (PS2) permettant l'interaction avec le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde. De manière préférée, les polypeptides selon l'invention sont caractérisés en ce que la partie de PS2 correspond
5 au fragment N-terminal hydrophile de PS2. Plus préférentiellement les polypeptides selon l'invention comprennent tout ou partie de la séquence SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

Selon un autre mode de réalisation, les polypeptides selon l'invention comportent au moins une partie de PS1 permettant l'interaction avec le précurseur du
10 peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde. De manière préférée les polypeptides selon l'invention comprennent tout ou partie de la séquence SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

Selon un autre mode de réalisation les polypeptides selon l'invention comprennent au moins les régions d'homologie communes aux séquences SEQ
15 IDN°1 et SEQ ID N°2.

Selon un autre mode de réalisation les polypeptides selon l'invention comportent au moins une partie du précurseur du peptide β -amyloïde. De manière préférée les polypeptides sont caractérisés en ce que la partie du précurseur du peptide β -amyloïde comprend tout ou partie du fragment 1-650, de préférence tout ou partie
20 du fragment 1-635 et de préférence encore tout ou partie du fragment 1-596. Plus préférentiellement, les polypeptides selon l'invention comportent tout ou partie d'une séquence choisie parmi la séquence correspondant au fragment 1-650 de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-635 de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-596 de la séquence SEQ ID N°3, ou
25 une séquence dérivée.

Au sens de la présente invention, le terme séquence polypeptidique dérivée désigne toute séquence polypeptidique différant des séquences présentées en séquence SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, et possédant la capacité d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son site d'interaction, celui d'améliorer son niveau de production, celui d'augmenter sa résistance aux protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs polypeptidiques décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules qui inhibent au moins partiellement l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde, et qui soient non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation de polypeptides tels que décrits ci-avant pour la préparation de molécules non peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des éléments structuraux de ces polypeptides qui sont importants pour leur activité et reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

Selon un mode de réalisation particulier, les polypeptides selon l'invention peuvent également comprendre des séquences permettant une localisation cellulaire précise. Parmi ces séquences on peut citer les séquences de peptide signal telles que la séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal des

sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine musculaires et centraux etc...

La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un peptide capable d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde. Selon un mode particulier, il s'agit d'une séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci. Selon un autre mode, il s'agit d'une séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci. De manière préférée, il s'agit d'une séquence nucléotidique comprenant les zones d'homologies communes aux séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2. Selon un autre mode, il s'agit d'une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence correspondant au fragment 1- 650 (acides nucléiques 1 à 1944) de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-635 (acides nucléiques 1 à 1914) de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-596 (acides nucléiques 1 à 1788) de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

Au sens de la présente invention, le terme séquence nucléotidique dérivée désigne toute séquence différant de la séquence considérée en raison de la dégénérescence du code génétique, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, ainsi que toute séquence hybridant avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et codant pour un polypeptide selon l'invention. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. Le terme dérivé comprend également les séquences homologues à la séquence considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes. De telles séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banque

d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde, la séquence native ou un fragment de celle-ci, dans des conditions variables d'hybridation (Maniatis et al.1982).

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de
5 séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de séquences présentées ci-avant. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaire
10 connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. D'une manière générale les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute technique connue de l'homme du métier.

15 Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de préparation des polypeptides de l'invention selon lequel on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit. Dans ce cas, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son
20 expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, séquence leader de sécrétion, etc.) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à
25 répllication autonomes chez l'hôte choisi. S'agissant de vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés, par exemple, en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformée avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'invention. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures-du-genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, de neuroblastomes humains etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Selon un mode préféré, les cellules hôtes sont avantageusement représentées par des souches de levures recombinantes pour l'expression des acides nucléiques de l'invention ainsi que la production des protéines dérivées de ceux-ci.

Préférentiellement, les cellules hôtes comprennent au moins une séquence ou un fragment de séquence choisis parmi les séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N° 2, ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3 pour la production des polypeptides selon l'invention.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées dans le cadre de thérapies géniques, pour le transfert et la production in vivo de polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

Selon autre mode de réalisation de l'invention, les séquences nucléotidiques de l'invention sont utilisées pour la construction d'une cassette d'expression, utilisable dans un vecteur d'expression. En particulier, la cassette d'expression sert à la production des polypeptides selon l'invention.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, incorporée ou

non dans un ADN recombinant, en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

Préférentiellement, les séquences nucléiques selon l'invention font partie d'un vecteur utile pour induire in vivo, ex vivo et/ou in vitro l'expression des polypeptides revendiqués. Le vecteur utilisé peut être d'origines diverses, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules nerveuses humaines. Il peut s'agir de vecteur viral, non viral ou d'un vecteur plasmidique. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut dériver des adénovirus, rétrovirus, virus adéno-associés (AAV), du virus de l'herpès, du cytomégalovirus (CMV), du virus de la vaccine, etc. Des vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, ou des AAV incorporant des séquences d'acides nucléiques hétérologues ont été décrits dans la littérature [Akli et al., Nature Genetics 3 (1993) 224 ; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241 ; EP 185 573, Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Le Gal la Salle et al., Science 259 (1993) 988 ; Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211 ; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353 ; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739 ; Miyano-hara et al., New Biol. 4 (1992) 238 ; WO91/18088].

La présente invention concerne donc également tout virus recombinant comprenant, insérée dans son génome, une séquence nucléique telle que définie avant.

Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par l'acide nucléique de l'invention.

Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus, un AAV ou un rétrovirus recombinaut défectif. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un adénovirus.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte. Préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation

préféré, il comprend une délétion dans la région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et la séquence codant. Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5. Selon un autre mode de réalisation préféré, la séquence d'acide nucléique exogène est insérée au niveau de la délétion dans la région E1.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la séquence nucléotidique telle que définie ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460). Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente demande a également pour objet des virus recombinants défectifs comprenant une séquence nucléique hétérologue codant pour un polypeptide selon l'invention.

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragment d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un polypeptide dont la séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 ou ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3, puis prélèvement du sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art. Les anticorps ou fragment d'anticorps selon l'invention peuvent notamment être utilisés pour d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables de moduler ou d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde. La mise en évidence et/ou d'isolement de tels composés est réalisé selon les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

5 La présente invention concerne également l'utilisation des polypeptides définis précédemment pour la mise en évidence de ligands des polypeptides ainsi que de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde

10 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs de par leur capacité à interférer au niveau de l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde peuvent en effet permettre de traiter certaines affections neurologiques et notamment la maladie d'Alzheimer.

15 L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un polypeptide tel que défini ci-avant.

Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-avant, et/ou un oligonucléotide antisens, et/ou un ligand tel que défini ci-avant. L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant
20 comme principe actif au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps, ligand et séquence nucléotidique définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

25 Elle a également pour objet les compositions dans lesquelles les séquences nucléotidiques selon l'invention sont incorporées dans un vecteur recombinant viral ou non viral.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées pour inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde. Il s'agit plus préférentiellement de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie d'Alzheimer.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation des polypeptides décrits auparavant pour inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde et de manière préférée l'utilisation de ces polypeptides pour le traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer.

La présente invention sera plus amplement détaillée à l'aide des exemples ci dessous considérés de manière descriptive et non limitative.

15 **Liste des figures**

Figure 1 : Schéma des constructions PS2 tronquées et expression en cellules COS1.

Figure 2 : Interaction des formes tronquées de PS2 avec APP.

Figure 3 : Interaction du N-term sécrété de PS2 (SecPS2NT) et de APP extracellulaire.

20 Figure 4 : Interaction de PS2 avec les formes tronquées de APP.

Figure 5 : Interaction de PS1 et PS1DC2 avec APP et sa forme courte.

Figure 6 : Interaction de PS1 et de APP en cellules d'insectes.

Figure 7 : Interaction de la forme sécrétée de PS2NT avec le peptide Ab dans le milieu extracellulaire.

25 Figure 8 : Reconstitution de l'interaction Ab/PS2Nt in vitro.

A) Dose-dépendance en fonction de la concentration de PS2Nt

B) Dose-dépendance en fonction de la concentration de Ab.

Figure 9 : Interaction in vitro des formes complètes de PS1 et APP.

Figure 10 : Structure et topologie de l'APP695

Figure 11 : Interaction de PS2 et PS2 NT avec une deuxième région de l'APP,

5 différente du peptide A β .

Matériels et méthodes

A/ MATERIELS

1.Constructions exprimant les présénilines.

10 L'obtention de vecteur d'expression (vecteur hôte, pcDNA3, *InVitrogen*) en cellules mammifères des protéines humaines PS1 et PS2 a été décrite précédemment (Pradier et col., 1996). Plusieurs délétions successives par l'extrémité C-term de PS2 ont été générées (voir Fig1A). Les numérotations sont faites à partir du codon d'initiation de PS2 comme
15 position 1.

Le fragment de restriction HindIII du vecteur PS2 (du 5' non-codant, position -55, au site interne à la position 1080) a été purifié et mis en ligation avec le vecteur pcDNA3 linéarisé par HindIII et traité à la phosphatase alcaline. La PS2 tronquée ainsi produite (PS2DC1) s'étend de
20 l'extrémité N-terminale au résidu 361 plus 7 résidus apportés par l'extrémité 3' et comprend donc les six premiers domaines transmembranaires et une large partie de la boucle hydrophile (Fig1A).

PS2DC2 a été construit par digestion du plasmide PS2 par PstI (site interne à position 679) et ligation avec le fragment PstI correspondant à la
25 partie 3'non-codante du vecteur PS2. La protéine tronquée PS2DC2 s'étend de la position 1 au résidu 228 de PS2 plus 18 résidus supplémentaires

apportés par l'extrémité 3'. Elle inclut les quatre premiers domaines transmembranaires de PS2.

Une construction similaire a été effectuée pour PS2 portant la mutation N141I, PS2DC2*.

5 Le fragment de restriction HindIII (-55)/MscI(590) de la construction PS2DC2 a ensuite été cloné dans le vecteur pcDNA3 traité HindIII et dont l'extrémité ApaI a été rendue à bout franc. Cette construction PS2DC3 s'étend de l'extrémité N-term au résidu 198 plus 2 résidus supplémentaires comprenant donc les trois premiers domaines
10 transmembranaires de PS2.

Le fragment de restriction de PS2DC2, HindIII (-55)/NcoI(504) rendu à bout francs en son extrémité NcoI par traitement au fragment Klenow de l'ADN polymérase a été recloné dans le même vecteur pcDNA3 HindIII/(ApaI bout franc) pour construire PS2DC4 s'étendant jusqu'au
15 résidu 168 de PS2 plus 3 résidus supplémentaires.

La construction de l'extrémité N-terminale hydrophile de PS2 a été obtenue par amplification de la séquence PS2 avec les oligonucléotides ext5':

5'-CGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC-3'

(chevauchant l'ATG initial, en gras, et introduisant un site de restriction
20 EcoRI, souligné) et ext3':

5'-CCGCTCGAGTCATTGTGCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG-
3' (introduisant un codon stop après le résidu 90 de PS2 ainsi qu'un site de restriction XhoI, souligné). Après clonage dans le vecteur pCRII par la méthode TA cloning (InVitrogen), la conformité du fragment de PCR a été
25 vérifié par séquençage. Ce fragment (EcoRI/XhoI) a ensuite été introduit dans un vecteur pcDNA3 en phase avec une séquence correspondant à l'épitope myc à son extrémité N-terminale: mycPS2Nter.

Pour ne pas préjuger de la topologie de PS2, le même fragment Nter a été reclone dans le vecteur pSectagB, en phase avec la séquence du peptide signal de IgkB pour diriger la sécrétion de la protéine pS2Nter: SecPS2-Nter.

5 L'extrémité C-term de PS2 a été construite de façon similaire à l'aide du fragment de restriction HindIII (1080)/PstI(en 3'non-codant) reclone dans le vecteur pSecTagB HindIII/PstI, SecPS2Cter s'étendant du résidu 361 à l'extrémité C-terminale, ou dans le vecteur pcDNA3myc en phase avec l'épitope myc.

10 De même, une construction tronquée de PS1 a été obtenue. Le vecteur pcDNA3-PS1 a été digéré par PflmI (site à la position 636 de la séquence nucléique codante de PS1) et XhoI dans le 3'non codant de la séquence de PS1. Ces sites ont été transformés à bout franc par traitement à la T4 ADN polyméase. Le fragment vecteur, purifié sur gel d'agarose, a été relié sur lui-même pour fournir un vecteur d'expression d'une PS1 tronquée
15 s'étendant du N-ter de PS1 jusqu'au résidu Ile213 (après le 5eme domaine transmembranaire) plus 12 résidus supplémentaires. Cette construction correspond à la chimère DC2 et est appelée PS1DC2 .

2.Constructions exprimant l'APP.

2.1 Constructions APP

20 Les différentes constructions APP complet (isoforme -695) et SPA4CT (les 100 derniers résidus de l'APP précédés d'un peptide signal pour insertion à la membrane) ont été décrites précédemment (Dyrks et coll., 1993). Les vecteurs, pour l'expression de C100 et du domaine cytoplasmique de l'APP, ont été obtenus de la manière suivante : les cDNA correspondants
25 ont été obtenus par amplification enzymatique de l'ADN (PCR = Polymerase Chain Reaction) en utilisant, comme amorce de synthèse, les oligonucléotides suivants: pour le C100 : les oligonucléotides 8172 et 8181; pour le domaine cytoplasmique de l'APP: les oligonucléotides 8171 et 8181.

Oligo 8172 5' CAAAGATCTGATGCAGAATTCCGACAT 3' ,
contenant:

- un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction BglII
(souligné)

5 - la séquence codante pour les acides aminés 597-602 de l'APP (en gras) [numérotation APP de 695 acides aminés]

Oligo 8181 5' CAAGCGGCCGCTCATCCCTTGTCATCGTCGTCCT

TGTAGTCTCCGTTCTGCATCTGCTC 3' contenant :

10 - un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction NotI
(souligné)

- la séquence complémentaire à la séquence codante pour les acides aminés 691-695 de l'APP (en gras) [numérotation APP de 695 acides aminés]

15 - la séquence complémentaire à la séquence Asp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys correspondant à l'épitope FLAG (en italique).

Oligo 8171 5' CAAAGATCTAAGAAACAGTACACATCC 3',
contenant:

- un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction BglII
(souligné)

20 - la séquence codante pour les acides aminés 650-655 de l'APP (en gras) [numérotation APP de 695 acides aminés]

Les produits de l'amplification enzymatique de l'ADN ont été clonés dans le vecteur pCRII. La séquence nucléotidique a été vérifiée par la méthode des terminateurs spécifiques d'ADN.

Les cDNA sont ensuite introduits par ligation dans le plasmide d'expression dérivé du plasmide pSV2 et contenant, dans le même cadre de lecture, un épitope MYC.

2.2.Construction des formes solubles de l'APP: α -sAPP et β -sAPP.

5 Les ADNc correspondants aux formes sécrétées de l'APP se terminant aux sites α - et β - de clivage ont été obtenus par PCR.

L'oligonucléotide 1:

5'-ccatcgatggctaCATCTTCACTTCAGAG-3' introduit:

10 - un codon stop (séquence complémentaire inverse soulignée) après la position 1788 de l'APP correspondant au site de clivage β .

-et un site de restriction ClaI.

L'oligonucléotide 2:

5'- ccatcgatggctaTTTTTGATGATGAAGCTTC -3' introduit:

15 - un codon stop (séquence complémentaire inverse soulignée) après la position 1836 de l'APP correspondant au site de clivage α .

-et un site de restriction ClaI.

L'oligonucléotide 3:

20 5'- CCGTGGAGCTCCTCCCG -3', commun pour les deux formes, correspond à la région 1583 à 1600 de l'APP incluant le site de restriction interne de l'APP SacI (souligné).

L'ADNc de l'APP a été amplifié par PCR en utilisant les paires oligo3-oligo1 et oligo3-oligo2 pour β -sAPP et α -sAPP respectivement. Les produits d'amplifications ont été sous-clonés comme précédemment en

pCRII et les séquences vérifiées par séquençage. Pour chacun, le fragment de restriction SacI-ClaI ont été purifiés et reclés dans le vecteur d'expression APP (voir ci-dessus) digéré lui-aussi par SacI-ClaI pour remplacer la partie C-terminale de l'APP par les fragments C-terminaux de β -sAPP et α -sAPP respectivement et reconstituer les protéines complètes.

3. Constructions baculovirus.

L'obtention de vecteur de transfert pour baculovirus codant pour la protéine humaine PS1 a été réalisé à partir de vecteur d'expression pour cellules de mammifères (Pradier et col, 1996). L'ADNc codant pour la protéine PS1 a été extrait par une digestion par les enzymes de restriction XhoI et NotI, puis cloné dans le plasmide de transfert pAcHTLB (protéine de fusion 6Histidines) et pAcSG2 (protéine native). L'obtention de baculovirus recombinants s'effectue selon le protocole du fournisseur (Pharmingen) et consiste à cotransfecter 2×10^6 cellules d'insectes (sf9) avec 1 μ g de plasmide de transfert contenant le gène d'intérêt et 0.5 μ g d'ADN viral (Baculogold). Après 5 jours à 27°C, les cellules sont grattées, puis centrifugées, le surnageant est utilisé comme stock viral pour l'amplification et la détermination du titre viral, l'expression de la protéine est visualisée par western blot sur le culot cellulaire.

L'obtention du baculovirus exprimant l'APP Humain (695) a été décrite précédemment (Essalmani et col, 1996).

Pour l'étude de l'expression de PS1 et d'APP, les cellules sf9 sont coinfectées à une M.O.I de 2 par des baculovirus exprimant l'APP humain (695), la protéine humaine Présiniline 1 (PS1), ou PS1 avec un tag 6 histidine en N terminal (6HisPS1), ou la protéine de contrôle de pseudomas putrida XylE avec un tag 6 histidine en N terminal (6HisXylE), puis solubilisées par un tampon Tris 10mM, NaCl 130mM, Triton X100 1%, NP 40 1%, pH 7.5.

Les protéines solubilisées sont immunoprécipitées par un anticorps antiHistidine (A), antiPS1 (1805)(B), ou antiAPP (22C11) (C). La présence de l'APP ou de PS1 a été révélée par western blot avec l'anticorps antiAPP aCT43(A), 22C11(B), ou l'anticorps antiPS1 95/23(C).

5

Les fractions solubilisées contenant l'APP, PS1 ou 6HisPS1 sont mélangées, puis immunoprécipitées en présence d'anticorps anti Histidines ou antiPS1 pendant une nuit à 4°C. La coimmunoprécipitation de l'APP est révélée après western blot avec les anticorps aCT43 ou 22C11.

5. Les plasmides

10

Les plasmides utilisés pour l'invention sont les suivants:

- pcDNA est un plasmide commercial (InVitrogen) utilisé pour le clonage et l'expression en cellules mammifères des séquences PS1 et PS2 et de leur formes tronquées.

15

- pCRII est un plasmide commercial (InVitrogen), utilisé pour le clonage de fragments de PCR

- pSecTagB est un plasmide commercial (InVitrogen), utilisé pour le clonage et l'expression en cellules mammifères d'ADNc auxquels sont rajoutés le signal de sécrétion (peptide signal Igκ).

20

- pSV2 est un plasmide commercial (Pharmacia), utilisé pour le clonage et l'expression en cellules mammifères d'ADNc.

- pAcHTLB est un plasmide commercial (Pharmingén), pour l'insertion d'un épitope (His)6 à des ADNc et la recombinaison homologue avec des baculovirus.

25

- pAcSG2 est un plasmide commercial (Pharmingén), pour la recombinaison homologue avec des baculovirus.

- pET29a est un plasmide commercial (Novagene), pour l'expression d'ADNc en bactéries.

B/ METHODES

5

1. Transfection de cellules

10

La méthode établie pour les cellules COS1 ou les cellules CHO, consiste à utiliser un lipofectant dans un ratio de 1 pour 8 (poids/poids) par rapport à l'ADN et un peptide synthétique H1 (séquence: KTPKKAKKPKTPKKAKKP) au même ratio afin d'optimiser la compaction de l'ADN et l'efficacité de transfection. Cette méthode repose notamment sur la neutralisation des charges des phosphates de l'ADN par les charges positives du lipofectant.

15

Les cellules COS1 sont cultivées en incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5 % de CO₂ dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 4.5 g/l glucose (Gibco-BRL) supplémenté avec 3 % de L-Glutamine, 1% de pénicilline-streptomycine et 10 % de Sérum de Veau Foetal.

20

La veille de la transfection, les cellules sont ensemencées à une densité de $2.5 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 100-mm. Le jour de la transfection les cellules sont rincées 2 fois par du PBS (Phosphate Buffer Saline) et une fois en OptiMEM (composition brevetée; Gibco-BRL) pour une habitude d'au moins 15 minutes en incubateur.

25

Par équivalent-boîte de 100 mm, 8 µg d'ADN plasmidique au total sont ajoutés à 300 µl d'OptiMEM et 64 µg de peptide H1. Après avoir vortexé vigoureusement pendant 10 secondes, on attend 5 minutes et la lipofectamine (32 µl, soit 64 µg) diluée dans 300 µl d'OptiMEM est ajoutée au mélange précédent. L'ensemble est une nouvelle fois vortexé

5 vigoureusement puis laissé 30 minutes reposer. Cinq millilitres d'OptiMEM sont ajoutés par tube et le mélange vortexé est placé sur les cellules (dont le milieu a été au préalable aspiré). Les cellules sont alors placées en incubateur pendant 4 heures, au terme desquelles le mélange est remplacé par du milieu complet.

2.Lyse des cellules et dosage des protéines

10 Les cellules sont le plus souvent lysées 48 heures après la transfection (au maximum habituel d'expression). Le tampon de lyse contient 10 mM de Tris pH 7.5, 1 mM d'EDTA, 1 % de Triton X100, 1 % de NP40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete©, Boehringer-Mannheim). Pour chaque plaque, après un rinçage au PBS, 800 µl du tampon froid sont ajoutés. Les lysats subissent alors une sonication suivie d'une agitation au barreau magnétique à 4°C pendant une nuit. Une centrifugation de 30 minutes à 15000 tr/mn sépare le culot du surnageant. Les protéines solubles sont alors dosées selon le kit BCA (Pierce) afin de pouvoir normaliser les expériences suivantes.

3.Immunoprécipitations

20 Les anticorps dirigés contre le peptide du N-term de PS2, 95041, (Blanchard et coll., 1997) et contre les vingt premiers acides aminés de PS1 (Duff et coll., 1996) ont été obtenus chez le lapin par immunisation avec des peptides synthétiques. Pour l'immuno-précipitation, 100 µg de protéines sont dilués dans 400 µl de RIPA modifié (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1 % Triton X100 v/v, 1% NP40 v/v). Trente microlitres de suspension de protéine A Sépharose (0.1 % m/v en solution de PBS) et 3 µl d'anticorps sont ajoutés. Les suspensions sont mélangées doucement sur un agitateur rotatif à 4°C pendant une nuit. Le complexe de protéine A Sépharose est lavé 3 fois avec 0.5 ml de RIPA modifié et une fois avec 0.5 ml de tampon de lavage « Wash C » (10 mM Tris pH 7.5).

4. Immunotransfert

5 Les échantillons (lysats de cellules) sont dénaturés dans un volume égal de tampon de dépôt (125 mM Tris pH 6.8, 4% m/v SDS, 20 % glycérol, 0.02 % Bromophénol Blue, 50 mM Dithiothreitol) à 95°C pendant 5 minutes. Pour l'analyse de l'expression des présénilines, les échantillons sont dénaturés en présence de 8 M urée et à 37 °C afin d'éviter l'agrégation propre aux présénilines à 95 °C.

10 Les échantillons sont déposés sur des gels Tris-Glycine (Novex), avec un pourcentage d'acrylamide différent selon le poids moléculaire à discriminer. Un marqueur de Poids Moléculaire est également déposé (Broad Range, BioRad). La migration a lieu pendant environ 2 heures à 100 Volts constants dans du tampon SDS 1X final (Novex). Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (Tampon de transfert 1X final (Novex) avec 10 % de méthanol) pendant 2 heures à 150 mA constants.

15 Après transfert, la membrane est bloquée pendant 2 heures à température ambiante dans 50 ml de PBS-T (PBS avec 0.5 % Tween) contenant 2 % de lait écrémé (Merck). L'anticorps primaire (dilué à la concentration optimale de l'ordre du 1/1000e au 1/5000e, dans du PBS-T avec ou sans 2 % de lait écrémé) est laissé sur une nuit à 4 °C. Après un bref rinçage en PBS-T, la membrane est incubée 45 minutes en présence du
20 deuxième anticorps (IgG-anti-souris-ou-anti-lapin selon le cas, couplé à la peroxydase de Raifort) dilué au 1/5000e dans un tampon dit « ECL » (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.1 %).

25 La membrane est alors rincée 4 fois 15 minutes dans le tampon «ECL». Elle peut être révélée par le réactif ECL (Amersham) constitué de 2 tampons à mélanger extemporanément en volume égal. Différentes expositions d'un film photographique (Hyperfilm ECL ; Amersham) sont effectuées, suivies d'un développement.

5. Fixation in vitro de PS2 NT avec le peptide A β Amyloïd

5.1 Production de la protéine recombinante PS2 NT en bactérie.

Pour la création d'un vecteur d'expression bactérien de PS2NT (amino acides 1 à 87), l'ADNc de PS2 a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides 3' (CCGCTCGAGTCATTGTCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG) et 5' (CCGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC). Le fragment résultant a été cloné dans pCRII et la séquence confirmée. Ce fragment a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pET29a (Novagene) en phase avec la séquence de l'étiquette S-tag. La protéine a été produite en bactérie BL21. Après induction à l'IPTG pour 5h, les bactéries ont été récupérées par centrifugation (10 min à 6000 tours/mn) et le culot cellulaire dissout en tampon RIPA (volume calculé en multipliant la DO de la culture après induction par le volume de culture divisé par 23). Les bactéries ont été lysées par sonication et le lysat centrifugé à 13000 tr/min pendant 20 min à 4°C. Le surnageant (extrait total) a été utilisé pour les études de fixation.

5.2 Test de fixation

Le peptide A β synthétique a été déposé sur membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell) en utilisant un appareil dot-blot 96 puits. Après dépôt, le filtre a été bloqué (envers les sites non-spécifiques de fixation de protéines) avec le réactif de bloc gélatine (Novagen) dilué au 10^{ème} en TBST. Après blocage, le filtre a été remplacé sur l'appareil de dot-blot et l'extrait bactérien PS2NT ajouté dans les puits pour une incubation de 2h à température ambiante. Comme contrôle, un extrait bactérien contenant le plasmide vide pET29 a été utilisé sur des puits en duplicat. Le filtre a ensuite été lavé une fois avec du tampon RIPA, puis retiré de l'appareil et lavé trois fois avec du PBST (15min pour chaque lavage). La détection de l'étiquette S-tag a ensuite été effectuée comme prescrit par le fournisseur.

effectuée par scanning optique du filtre et quantification de l'intensité dans chaque puit par le logiciel Tina 2.1 (Raytest).

EXEMPLES

Exemple 1. Interaction entre APP et PS2 et cartographie de la zone d'interaction sur PS2.

L'interaction entre les protéines APP et PS2 en cellules mammifères est exemplifié dans la figure 2. Le lysât de cellules COS transfectées avec PS2 et APP est soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre le N-term de PS2 (95041, Blanchard et col., 1997). L'immunoprecipitat est ensuite analysé par immunotransfert avec un anticorps contre l'APP. L'APP est clairement détecté dans les immunoprecipitats des cellules cotransfectées avec APP et PS2 mais pas en l'absence de PS2 (Fig2., piste 6 par rapport à piste 7) comme précédemment décrit (Weidemann et col., 1997). Pour cartographier la zone d'interaction entre ces deux protéines, plusieurs formes tronquées de PS2 ont été construites. Afin de conserver la topologie membranaire de PS2 déterminée en général par la partie N-term des protéines membranaires, des tronquations progressives de l'extrémité C-term de PS2 ont été produites se terminant après différents domaines transmembranaires TM6 (PS2DC1), TM4 (PS2DC2), TM3 (PS2DC3) et TM2 (PS2DC4), schéma Fig1A. L'extrémité N-term hydrophile (87 résidus) de PS2 a aussi été construite sous forme cytoplasmique (séquence native) ou sous forme sécrétée par l'insertion du peptide signal de la chaîne Igk. L'expression de ces différentes formes est exemplifiée figure 1B, révélée à l'aide de l'anticorps anti-PS2 (95041). Les constructions possédant des domaines hydrophobes présentent en plus des bandes correspondant aux formes monomériques au poids moléculaires attendus (formant ici des doublets rapprochés), des formes dimériques et des agrégats de haut poids moléculaires typiques de PS2 (Fig1B, pistes 3-5). En particulier pour PS2 complète, seuls ces agrégats sont détectables dans cette figure tandis que la forme monomérique n'est pas détectable (piste 6). Les deux constructions du N-term hydrophille de PS2: mycPS2Nt et SecPS2Nt donnent lieu aux bandes aux poids moléculaires attendus (Fig1B, pistes 1 et

2.). La construction SecPS2Nt est également sécrétée dans le milieu extracellulaire (Fig3, piste 2) tandis que la construction mycPS2Nt est, elle, cytoplasmique.

5 Ces constructions ont été cotransfectées individuellement avec l'APP. La fraction détergent-soluble des lysats cellulaires a été immunoprécipitée avec l'anticorps dirigé contre le N-term de PS2 et ces immunoprécipitats analysés par immunoblots. Comme avec la PS2 complète, l'APP est détectable dans les immunoprécipitats avec toutes les formes tronquées de PS2, PS2DC2 à PS2DC4 (Fig2, pistes 3-5) démontrant
10 l'interaction entre APP et les formes contenant le N-term de PS2. Cette interaction avec l'APP est conservée avec la construction N-term de PS2 sous sa forme sécrétée (Fig2, piste 2) démontrant que l'ancrage de PS2Nt dans la membrane lipidique n'est pas nécessaire pour cette interaction. Par
15 opposition, la forme cytoplasmique mycPS2NT n'interagit pas avec APP (Fig2,piste 1).

L'expérience inverse d'immunoprécipitation par un anticorps anti-APP et de la détection par l'anticorps N-term de PS2 a permis de confirmer l'interaction entre l'APP et SecPS2Nt dans des conditions expérimentales différentes .

20 Dans le milieu de culture des cellules cotransfectées avec APP et SecPS2Nt, une interaction entre ces deux protéine est également démontrée par coimmunoprécipitation (Fig3A, piste4 et Fig3B, piste3). La forme mycPS2NT n'interagit pas avec APP dans le milieu non plus (Fig3B, piste2). La présence de cette interaction dans le milieu, démontre que le complexe
25 APP/PS2Nt est relativement stable au cours du processus de sécrétion.

Exemple 2. Interaction entre APP et PS2 et cartographie de la zone d'interaction sur APP.

Des formes tronquées de l'APP ont été utilisées pour délimiter la zone d'interaction sur l'APP. Une construction comportant les 100 derniers résidus de l'APP sous le contrôle ou non d'un peptide de sécrétion (SPA4CT et C100, Dyrks et col., 1993) et une construction comportant seulement le domaine cytoplasmique (les 45 derniers résidus de l'APP) ont été utilisées et leur présence détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le domaine cytoplasmique de l'APP (CT43, Stephens et Austen, 1996). Dans les cellules cotransfectées avec PS2, une interaction de SPA4CT mais pas du domaine cytoplasmique de l'APP avec PS2 a pu être mise en évidence (Fig4A, comparer piste 4 et 5). L'interaction de PS2 avec la construction C100 (sans signal de sécrétion) a aussi pu être démontrée (Fig4B, piste 7). Même en associant le domaine cytoplasmique de l'APP à la membrane dans une construction chimérique avec le récepteur alpha de l'IL2, aucune interaction avec PS2 n'a pu être observée. L'interaction avec SPA4CT mais pas avec le domaine cytoplasmique indique donc que sur l'APP, la région du A β et le reste du segment transmembranaire est suffisante pour l'interaction avec PS2.

Exemple 3. Interaction de PS1 avec APP et cartographie initiale.

Par analogie aux résultats obtenus pour PS2 (exemples 1 et 2), l'étude de l'interaction de PS1 avec APP a été réalisée dans le même système cellulaire COS1, après coimmunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre les 20 derniers acides aminés de PS1 (Duff et col., 1996), le SPA4CT, le fragment C-terminal de l'APP, peut être détecté dans les précipitats (Fig5A, piste4). L'APP aussi interagit avec PS1. De même, la forme tronquée de PS1, PS1DC2(1-213), interagit avec APP (Fig5B. piste4). Ces premières données nous permettent d'envisager que les régions d'interaction entre APP et PS1 doivent être voisines de celles exemplifiées précédemment avec PS2.

Pour vérifier la validité et la généralité de cette interaction PS1/APP, un système cellulaire différent a été utilisé, dans lequel les cellules d'insectes ont été infectées par des baculovirus recombinants exprimant la PS1 avec ou sans étiquette His6 et l'APP (c.f. Matériels et méthodes).

5 L'étude des lysats cellulaires a permis de détecter l'APP dans les immunoprécipitats antiHis6 (pour la PS1-His6, Fig6A, piste4) ou antiPS1 (pour la PS1 avec ou sans His6, Fig6B, pistes 4 et 5) lorsque les cellules sont coinfectedes avec les deux types de virus recombinants mais pas lorsqu'une seule des protéines est exprimée (pistes 1,2 et 3 correspondantes).

10 Inversement, dans les immunoprécipitats anti-APP, les protéines PS1-His6 et PS1 sont détectables (Fig6C, pistes 4 et 5) pour les doubles infections. Cette expérience permet de confirmer l'interaction dans le sens inverse avec des anticorps différents.

Exemple 4. Interaction de A β et PS2 en cellules

15 Etant donné que la région d'interaction entre l'APP et la PS2 implique sur l'APP, une région incluant le peptide amyloïde (de 595 à 635) et sur la PS2, son domaine N-term hydrophile, il est démontré dans cet exemple que cette dernière interagissait directement avec le peptide amyloïde (A β) produit par des cellules. L'expression de SPA4CT (correspondant aux

20 100 derniers résidus de l'APP précédés d'un peptide signal) en cellules COS conduit à une forte production du peptide amyloïde, en partie car SPA4CT est considéré comme le précurseur biologique du A β . Les cellules COS ont été transfectées avec SPA4CT seul, SPA4CT et SecPS2Nt ou avec SecPS2Nt seul. Les milieux extracellulaires correspondant ont été immunoprécipités

25 avec l'anticorps antiPS2 et le peptide A β a été détecté grâce à l'anticorps spécifique W02 (Nida et al. (1996) J. Biol. Chem.271, 22908-914)(Fig7). Le peptide A β est identifié seulement pour les cellules cotransfectées avec SecPS2Nt et SPA4CT comme une bande de faible intensité (Fig7, piste 1) mais pas avec les contrôles individuels (Pistes 2 et 3). Par ailleurs, une bande

supplémentaire à approximativement 40 kDa est aussi détectée de façon spécifique pour les cellules doublement transfectées. Après lavage du filtre et détection avec l'anticorps PS2, il apparaît qu'une bande au même poids moléculaire est également PS2-immunoréactive (Fig7, piste 4). Cette bande est aussi présente pour les cellules transfectées avec SecPS2Nt comme attendu. Ainsi, dans les cellules doublement transfectées, cette bande représente un complexe SDS-stable entre SecPS2Nt et le A β , pouvant confirmer l'interaction entre ces deux entités. La faible différence de masse apportée par le peptide A β (4kDa) expliquerait qu'il n'y ait pas de différence de taille détectable avec les cellules transfectées avec SecPS2Nt seulement. Les résultats de ces expériences permettent de conclure que la forme sécrète de PS2 (secPS2Nt) interagit in vitro avec le peptide A β (595-635).

Exemple 5. Reconstitution de l'interaction de A β et PS2Nt en test in vitro.

Pour confirmer l'interaction entre le peptide A β et PS2Nt (extrémité N-terminale de PS2), un test de fixation in vitro a été développé. Une protéine de fusion PS2Nt portant le peptide marqueur S (S-tag) à son extrémité N-terminale a été exprimée en bactérie. Les peptides A β 1-40 et A β 1-42 ont été déposés sur membranes de nitrocellulose qui ont été incubées en présence d'un extrait bactérien exprimant la protéine PS2Nt. Le S-tag a ensuite été révélé par la protéine fixatrice du S-tag couplé à l'alkaline phosphatase et par réaction colorimétrique. La protéine S-tag-PS2Nt se fixe bien sur les peptides A β dans ce test in vitro (Fig8A). Comme contrôles, des duplicats ont été incubés en présence d'un extrait bactérien n'exprimant que le peptide S qui est utilisé comme niveau de fixation non-spécifique sur le peptide A β (formes 1-40 et 1-42). Des dilutions sérielles de l'extrait bactérien permettent d'établir que cette fixation est dose-dépendante et saturable. Dans cette expérience, la fixation semble être plus importante sur le A β 1-42 que sur le A β 1-40 avec cependant une certaine variabilité. Par

exemple, la fixation de PS2Nt est dépendante de la dose de A β déposée sur la membrane, alors que A β 1-40 et A β 1-42 présentent des valeurs équivalentes de fixation.

5 Cet exemple fourni une confirmation de la reconstitution de l'interaction PS2Nt-APP(A β) in-vitro entre les formes A β 1-40 et A β 1-42 synthétiques d'origine bactérienne. Etant donné que les mutations pathologiques de PS2 conduisent à une augmentation du ratio A β 1-42/A β 1-40 produit dans de nombreux systèmes et que par ailleurs, il y a interaction physique entre PS2 et APP, il apparaît que cette interaction physique est
10 impliquée dans la production du peptide A β 1-42. Ainsi, l'inhibition de cette interaction constitue une approche thérapeutique extrêmement originale pour la maladie d'Alzheimer.

Exemple 6. Reconstitution de l'interaction APP/PS1 in vitro

15 Le système d'expression baculovirus permettant l'expression de grandes quantités de protéines recombinantes, les lysats de cellules infectées par chacun des trois virus ont été utilisés comme source de protéines APP, PS1 et PS1-His6. Les fractions solubilisées contenant l'APP, PS1 ou 6HisPS1 sont mélangées, puis immunoprécipitées en présence d'anticorps anti Histidines ou antiPS1 pendant une nuit à 4°C. L'APP est clairement
20 détecté dans les immunoprécipitats (Fig 9A, piste3 et Fig9B, piste 3) démontrant que l'interaction APP avec PS1-His ou PS1 est reconstituée in vitro par incubation des deux protéines. L'APP seul semble être faiblement précipité par l'anticorps anti-PS1 (Fig9B, piste1) mais pas avec l'anticorps anti-His confirmant la spécificité de l'interaction dans ce cas-là. Ces résultats
25 permettent la mise au point d'un test d'interaction in-vitro des deux protéines complètes APP et PS1.

Exemple 7. SecPS2Nt bloque l'interaction de APP et PS1 en cellules transfectées.

Il a été démontré dans les exemples précédents que APP interagit avec PS1 de façon semblable à PS2 et que pour cette dernière, la construction SecPS2Nt suffit à l'interaction avec APP. Cet exemple a pour but d'évaluer si la fixation de SecPS2Nt sur l'APP peut bloquer l'interaction avec PS1 de façon croisée (hétérologue). Dans le système COS1, le SPA4CT (correspondant aux 100 derniers résidus de l'APP précédés d'un peptide signal) peut être détecté dans les immunoprécipitats anti-PS1 des cellules exprimant SPA4CT et PS1 ou PS1 mutant, PS1*, (Fig10A, pistes 1 et 2.). Par opposition, lorsque SecPS2NT est cotransfecté, le signal SPA4CT disparaît quasiment dans les immunoprécipitats anti-PS1 (Fig4A, pistes 3 et 4). Après l'immunoprécipitation anti-PS1, les surnageants (fraction non-liée à la protéine A sépharose) ont subi une seconde immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PS2. Le SPA4CT est clairement détecté dans les cellules cotransfectées avec PS1 et SecPS2Nt (Fig10B, pistes 3 et 4) démontrant que dans ces cellules, SecPS2Nt en se fixant, a déplacé la fixation de SPA4CT sur PS1. Cette expérience nous permet donc de conclure que SecPS2Nt est une molécule capable non seulement de se fixer sur APP, mais aussi de déplacer la fixation de APP sur PS1 et vraisemblablement PS2. SecPS2Nt peut donc en cellules servir de leurre pour bloquer l'interaction APP avec les deux présénilines, PS1 et PS2. En effet, les résultats de la cartographie de l'interaction PS1/APP, confirment que les zones d'interaction mises en jeu sont similaires à celles de PS2.

Exemple 8. PS2 interagit avec un deuxième segment de APP, autre que A β .

Il a été précédemment démontré que SecPS2NT interagit dans le milieu extracellulaire avec les formes sécrétées de APP (Fig3A, piste 4). Les formes sécrétées de l'APP sont libérées après clivage soit au site β (position 595), correspondant au début du peptide A β , soit au site α (position 612) au sein même de ce peptide. Ces résultats suggèrent que PS2NT interagit aussi

5

APP ont été construites, par insertion d'un codon stop aux sites β (β -sAPP) et α (α -sAPP) et ont été testées. PS2 complet et SecPS2NT interagissent effectivement avec α -sAPP (Fig 11, pistes 3 et 5) et β -sAPP (Fig 11, pistes 4 et 6). Ces résultats établissent qu'un segment de APP compris entre la position 1 et 595 (et donc autre que le A β) est également capable d'interagir avec PS2 et PS2NT. Ces résultats permettent en outre de confirmer que l'interaction PS2NT/APP peut avoir lieu en absence d'ancrage à la membrane des deux partenaires et dans le compartiment luminal (ou extracellulaire) de la cellule.

Références

- Doan et col. (1996) Protein topology of presenilin1. *Neuron* 17:1023-1030.
- Thinakaran et col., (1996) Endoproteolysis of Presenilin1 and accumulation of
 5 processed derivatives in vivo. *Neuron* 17:181-190.
- Podlisny et col., (1997) Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis
 between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in
 normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiology of Disease* 3:325-337.
- Pradier, L., Czech, C., Mercken, L., Revah, F. and Imperato, A. (1996) Biochemical
 10 characterization of presenilins (S182 and STM2) proteins. *Neurobiol. Aging* 17:
 S137
- Scheuner et coll. (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile
 plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2
 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2: 864-
 15 870.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Mönning, U., Urmoneit, B., Turner, J. and Beyreuther, K.
 (1993) Generation of bA4 from the amyloid protein precursor and fragment
 thereof. *FEBS Lett.* 335:89-93.
- Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C., &
 20 Beyreuther, K. (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's
 disease gene products: Presenilin-2 and b-Amyloid precursor protein. *Nature*
 Medicine 3: 328-332
- Blanchard, V., Czech, C., Bonici, B., Clavel, N., Gohin, M., Dalet, K., Revah, F.,
 Pradier, L., Imperato, A. and S. Moussaoui. (1997) Immunohistochemical
 25 analysis of presenilin 2 expression in the mouse brain: distribution pattern and
 co-localization with presenilin 1 protein. *Brain Res.* 758:209-217.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky,
 T., Prada, C.-M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R.,
 Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N., Price, D.L.,
 30 Younkin, S.G. and S. Sisodia (1996) Familial Alzheimer's disease-linked

- presenilin 1 variants elevate Ab1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**: 1005-1013
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.-M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L; Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L.,
5 Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. and S. Younkin (1996) Increased amyloid-
b42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin1. *Nature* **383**:710-713.
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosci.* **20**: 154-159.
- Stephens, D.J. and B.M. Austen (1996) Metabolites of the b-amyloid precursor
10 protein generated by b-secretase localise to the Trans-Golgi Network and late
endosome in 293 cells. *J. Neurosci. Res* **46**:211-225.
- Essalmani, R., Guillaume, J.-M., Mercken, L., and Octave, J.-N. (1996).
Baculovirus-Infected Cells Do not Produce the Amyloid Peptide of Alzheimer's
Disease from its Precursor. *FEBS Lett.* **389**: 157-161.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER
 (B) RUE: 20 Avenue Raymond Aron
 (C) VILLE: Antony
 (E) PAYS: France
 (F) CODE POSTAL: 92165
 (H) TELECOPIE: 01.55.71.72.91

10

- (ii) TITRE DE L' INVENTION: Peptides capables d'inhiber
 l'interaction entre les presenilines et le precurseur du peptide
 beta-amyloide et ou le peptide beta-amyloide.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

20

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 261 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

40

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..261

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG CTC ACA TTC ATG GCC TCT GAC AGC GAG GAA GAA GTG TGT GAT GAG
 48
 50 Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Glu Val Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 CGG ACG TCC CTA ATG TCG GCC GAG AGC CCC ACG CCG CGC TCC TGC CAG
 96
 55 Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser Cys Gln
 20 25 30
 GAG GGC AGG CAG GGC CCA GAG GAT GGA GAG AAT ACT GCC CAG TGG AGA
 144
 60 Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln Trp Arg

```

          35              40              45
AGC CAG GAG AAC GAG GAG GAC GGT GAG GAG GAC CCT GAC CGC TAT GTC
192
5 Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg Tyr Val
   50              55              60

TGT AGT GGG GTT CCC GGG CGG CCG CCA GGC CTG GAG GAA GAG CTG ACC
240
-10 Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Leu Thr
    65              70              75              80

CTC      AAA      TAC      GGA      GCG      AAG      CAT
261
15 Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His
    85

```

```

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

    (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
        (A) LONGUEUR: 243 paires de bases
        (B) TYPE: nucléotide
        (C) NOMBRE DE BRINS: double
25    (D) CONFIGURATION: linéaire

    (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

    (iii) HYPOTHETIQUE: NON
30    (iv) ANTI-SENS: NON

    (ix) CARACTERISTIQUE:
        (A) NOM/CLE: CDS
35    (B) EMPLACEMENT: 1..243

```

```

    (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

40 ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA CAG ATG
   48
Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met
   1       5       10       15

45 TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT GAC AAT
   96
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn
   20              25              30

50 AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT GAG
  144
Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu
   35              40              45

55 CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG GAG
  192
Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu
   50              55              60

```

CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC AAG
 240
 Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys
 65 70 75 80

5

CAT
 243
 His

10

(2) INFORMATIONS-POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 2088 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

20

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

25

(ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMENT:1..2088

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG CTG CCC GGT TTG GCA CTG CTC CTG CTG GCC GCC TGG ACG GCT CGG
 48
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 35 1 5 10 15

35

GCG CTG GAG GTA CCC ACT GAT GGT AAT GCT GGC CTG CTG GCT GAA CCC
 96
 Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 40 20 25 30

40

CAG ATT GCC ATG TTC TGT GGC AGA CTG AAC ATG CAC ATG AAT GTC CAG
 144
 Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 45 35 40 45

45

AAT GGG AAG TGG GAT TCA GAT CCA TCA GGG ACC AAA ACC TGC ATT GAT
 192
 Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 50 55 60

50

ACC AAG GAA GGC ATC CTG CAG TAT TGC CAA GAA GTC TAC CCT GAA CTG
 240
 Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 55 65 70 75 80

55

CAG ATC ACC AAT GTG GTA GAA GCC AAC CAA CCA GTG ACC ATC CAG AAC
 288
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 60 85 90 95

60

TGG TGC AAG CGG GGC CGC AAG CAG TGC AAG ACC CAT CCC CAC TTT GTG
 336
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 5
 ATT CCC TAC CGC TGC TTA GTT GGT GAG TTT GTA AGT GAT GCC CTT CTC
 384
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 10
 GTT CCT GAC AAG TGC AAA TTC TTA CAC CAG GAG AGG ATG GAT GTT TGC
 432
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 15
 GAA ACT CAT CTT CAC TGG CAC ACC GTC GCC AAA GAG ACA TGC ACT GAG
 480
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 20
 AAG AGT ACC AAC TTG CAT GAC TAC GGC ATG TTG CTG CCC TGC GGA ATT
 528
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 25
 GAC AAG TTC CGA GGG GTA GAG TTT GTG TGT TGC CCA CTG GCT GAA GAA
 576
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 30
 AGT GAC AAT GTG GAT TCT GCT GAT GCG GAG GAG GAT GAC TCG GAT GTC
 624
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 35
 TGG TGG GGC GGA GCA GAC ACA GAC TAT GCA GAT GGG AGT GAA GAC AAA
 672
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 40
 GTA GTA GAA GTA GCA GAG GAG GAA GAA GTG GCT GAG GTG GAA GAA GAA
 720
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 45
 GAA GCC GAT GAT GAC GAG GAC GAT GAG GAT GGT GAT GAG GTA GAG GAA
 768
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 50
 GAG GCT GAG GAA CCC TAC GAA GAA GCC ACA GAG AGA ACC ACC AGC ATT
 816
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 55
 GCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACA GAG TCT GTG GAA GAG GTG GTT CGA
 864
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 60

GTT CCT ACA ACA GCA GCC AGT ACC CCT GAT GCC GTT GAC AAG TAT CTC
 912
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300

5

GAG ACA CCT GGG GAT GAG AAT GAA CAT GCC CAT TTC CAG AAA GCC AAA
 960
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320

10

GAG AGG CTT GAG GCC AAG CAC CGA GAG AGA ATG TCC CAG GTC ATG AGA
 1008
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335

15

GAA TGG GAA GAG GCA GAA CGT CAA GCA AAG AAC TTG CCT AAA GCT GAT
 1056
 Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350

20

AAG AAG GCA GTT ATC CAG CAT TTC CAG GAG AAA GTG GAA TCT TTG GAA
 1104
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365

25

CAG GAA GCA GCC AAC GAG AGA CAG CAG CTG GTG GAG ACA CAC ATG GCC
 1152
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380

30

AGA GTG GAA GCC ATG CTC AAT GAC CGC CGC CGC CTG GCC CTG GAG AAC
 1200
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400

35

TAC ATC ACC GCT CTG CAG GCT GTT CCT CCT CGG CCT CGT CAC GTG TTC
 1248
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415

40

AAT ATG CTA AAG AAG TAT GTC CGC GCA GAA CAG AAG GAC AGA CAG CAC
 1296
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430

45

ACC CTA AAG CAT TTC GAG CAT GTG CGC ATG GTG GAT CCC AAG AAA GCC
 1344
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445

50

GCT CAG ATC CGG TCC CAG GTT ATG ACA CAC CTC CGT GTG ATT TAT GAG
 1392
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460

55

CGC ATG AAT CAG TCT CTC TCC CTG CTC TAC AAC GTG CCT GCA GTG GCC
 1440
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480

60

5 GAG GAG ATT CAG GAT GAA GTT GAT GAG CTG CTT CAG AAA GAG CAA AAC
 1488
 Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
 485 490 495

10 TAT TCA GAT GAC GTC TTG GCC AAC ATG ATT AGT GAA CCA AGG ATC AGT
 1536
 Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
 500 505 510

15 TAC GGA AAC GAT GCT CTC ATG CCA TCT TTG ACC GAA ACG AAA ACC ACC
 1584
 Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
 515 520 525

20 GTG GAG CTC CTT CCC GTG AAT GGA GAG TTC AGC CTG GAC GAT CTC CAG
 1632
 Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
 530 535 540

25 CCG TGG CAT TCT TTT GGG GCT GAC TCT GTG CCA GCC AAC ACA GAA AAC
 1680
 Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
 545 550 555 560

30 GAA GTT GAG CCT GTT GAT GCC CGC CCT GCT GCC GAC CGA GGA CTG ACC
 1728
 Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
 565 570 575

35 ACT CGA CCA GGT TCT GGG TTG ACA AAT ATC AAG ACG GAG GAG ATC TCT
 1776
 Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
 580 585 590

40 GAA GTG AAG ATG GAT GCA GAA TTC CGA CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT
 1824
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 595 600 605

45 CAT CAT CAA AAA TTG GTG TTC TTT GCA GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA
 1872
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 610 615 620

50 GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG
 1920
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
 625 630 635 640

55 ATC GTC ATC ACC TTG GTG ATG CTG AAG AAG AAA CAG TAC ACA TCC ATT
 1968
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
 645 650 655

60 CAT CAT GGT GTG GTG GAG GTT GAC GCC GCT GTC ACC CCA GAG GAG CGC
 2016
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
 660 665 670

CAC CTG TCC AAG ATG CAG CAG AAC GGC TAC GAA AAT CCA ACC TAC AAG
 2064
 5 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
 675 680 685
 TTC TTT GAG CAG ATG CAG AAC TAG
 2088
 10 Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn *
 690 695

REVENDICATIONS

1. Polypeptide capable d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

5 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie de PS2 permettant l'interaction avec le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde

3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que la partie de PS2 correspond au fragment N-terminal hydrophile de PS2.

10 4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

5. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie de PS1 permettant l'interaction avec le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

20 7. Polypeptide selon l'une des revendication 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comprend au moins les régions d'homologie communes aux séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

8. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie du précurseur du peptide β -amyloïde.

9. Polypeptide selon la revendication 8 caractérisé en ce que la partie du précurseur du peptide β -amyloïde comprend tout ou partie du fragment 1-650, de
5 préférence tout ou partie du fragment 1-635 et de préférence encore tout ou partie du fragment 1-596.

10. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il comporte tout ou partie d'une séquence choisie parmi la séquence correspondant au fragment 1-650 de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-635 de la
10 séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-596 de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

11. Composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde obtenu par reproduction des motifs
15 actifs des peptides selon les revendications 1 à 10 par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

12. Polypeptide selon l'une des revendication 1 à 11 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence signal.

13. Polypeptide selon la revendication 12 caractérisé en ce que la séquence
20 signal est choisie parmi séquence du peptide signal de IgkB le peptide signal de l'APP, les peptides signal des sous-unités des récepteur nicotinique de l'acétylcholine musculaires et centraux.

14. Séquence nucléotidique codant pour un peptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 10.

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

5 16. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

17. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant essentiellement les zones d'homologies communes aux séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

10 18. Séquence nucléotidique selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence choisie parmi la séquence correspondant au fragment 1-650 (acides nucléiques 1 à 1944) de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-635 (acides nucléiques 1 à 1914) de la séquence SEQ ID N°3, ou la séquence correspondant au fragment 1-596 (acides nucléiques 1 à 1788) de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

15

19. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 à 18 dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit.

20 20. Cellule hôte pour la production d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle a été transformée avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 à 18.

21. Anticorps ou fragment d'anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 10 et en ce qu'il possède la faculté

d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

22. Procédé de mise en évidence ou d'isolement de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- a - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée exprimant un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 10 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
- b - on détecte et/ou isole les molécules liées audit polypeptide.

23. Ligand d'un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 10, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 22.

- 24. Virus recombinant défectif comprenant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 10.

25. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 14 à 18.

- 26. Vecteur selon la revendication 25 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique.

27. Vecteur selon la revendication 25 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

28. Vecteur selon la revendication 27 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus défectif pour la réplication.

29. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs vecteurs selon l'une des revendications 25 à 28.

5 30. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 12.

31. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 21 et/ou un ligand selon la revendication 23.

10 32. Composition selon l'une des revendications 29 à 31 destinée à inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde.

33. Composition selon l'une des revendications 29 à 32 destinée au traitement des maladies neurodégénératives.

15

34. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 13 pour inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou le peptide β -amyloïde

20 35. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 13 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des maladies neurodégénératives et notamment de la maladie d'Alzheimer.

25 36. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 13 pour la mise en évidence de ligands des polypeptides et/ou de composés capables d'inhiber au moins

en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide β -amyloïde
et/ou le peptide β -amyloïde

37. Utilisation des sequences nucléotidiques selon les revendications 14 à 18
5 pour la construction d'une cassette d'expression utilisable dans un vecteur selon les
revendications 25 à 28 .

38. Cassette d'expression utilisable dans un vecteur défini selon les
revendications 25 à 28 pour la production de polypeptides selon les revendications 1 à
10 13.

1/16

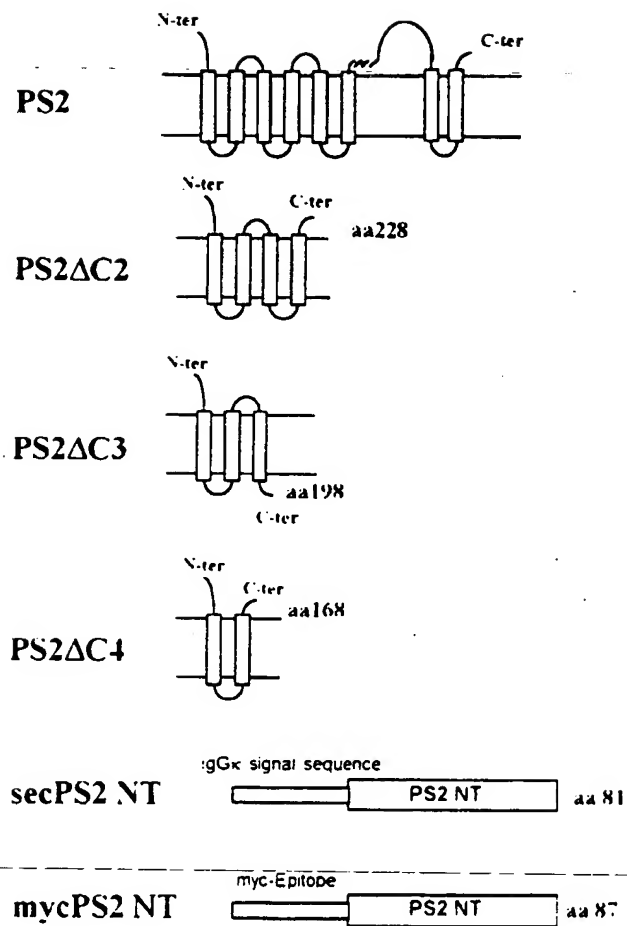


figure 1A

2/16

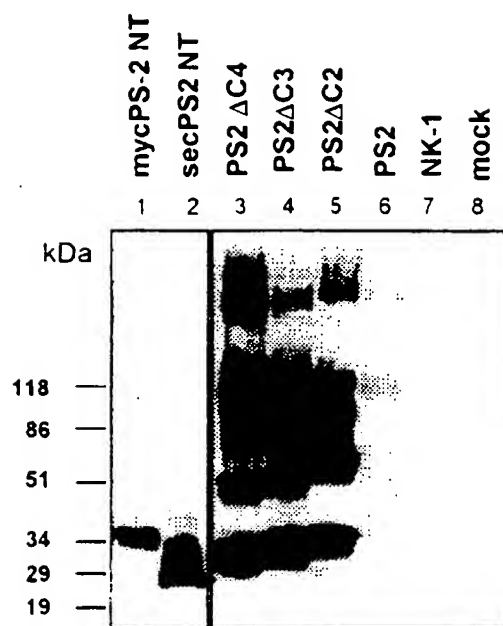


figure 13

3/16

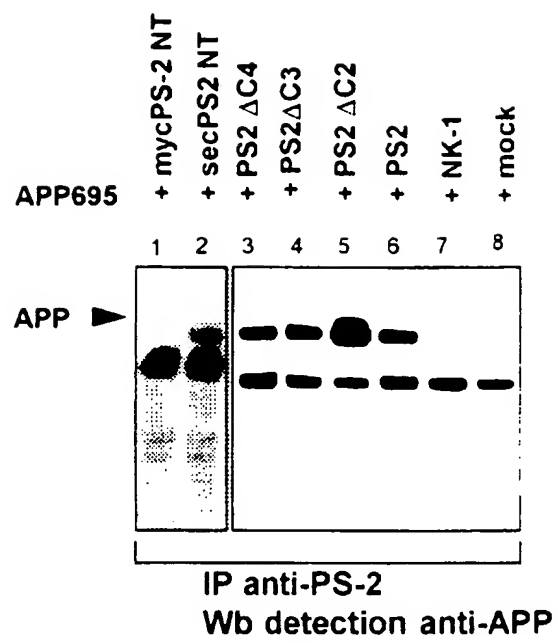


figure 2

4/16

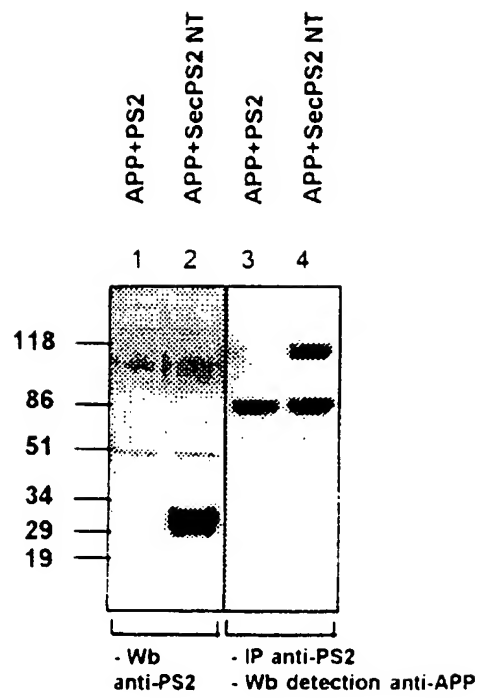


figure 3A

5/16

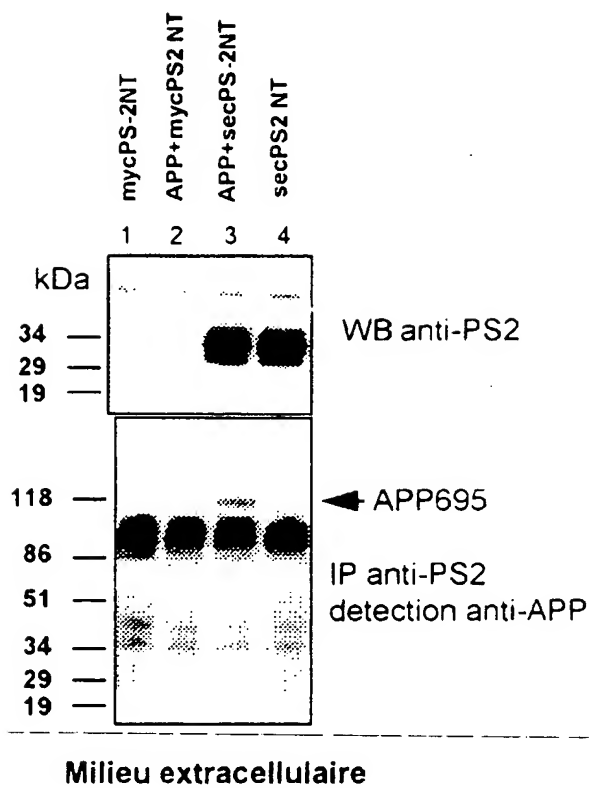


figure 3B

6/16

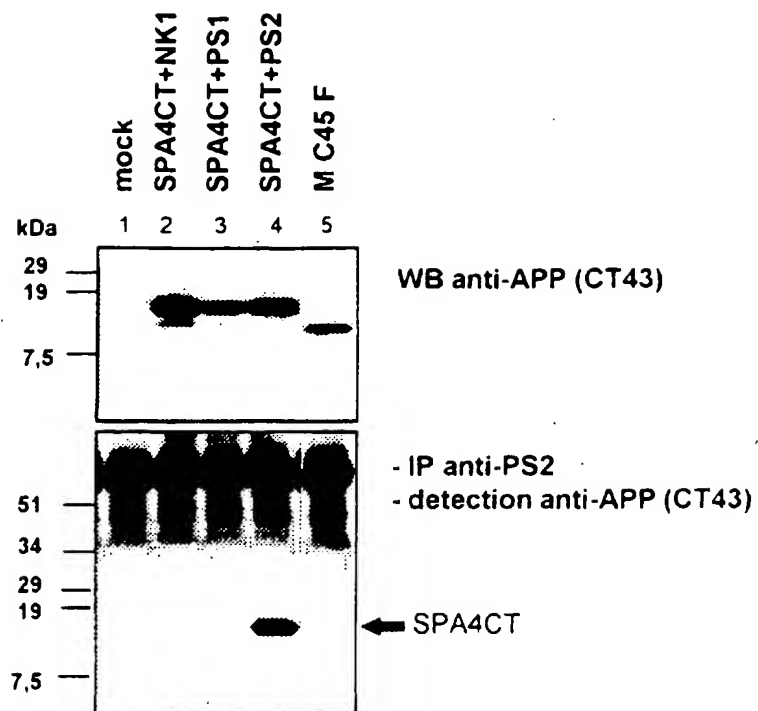


figure 4A

7/16

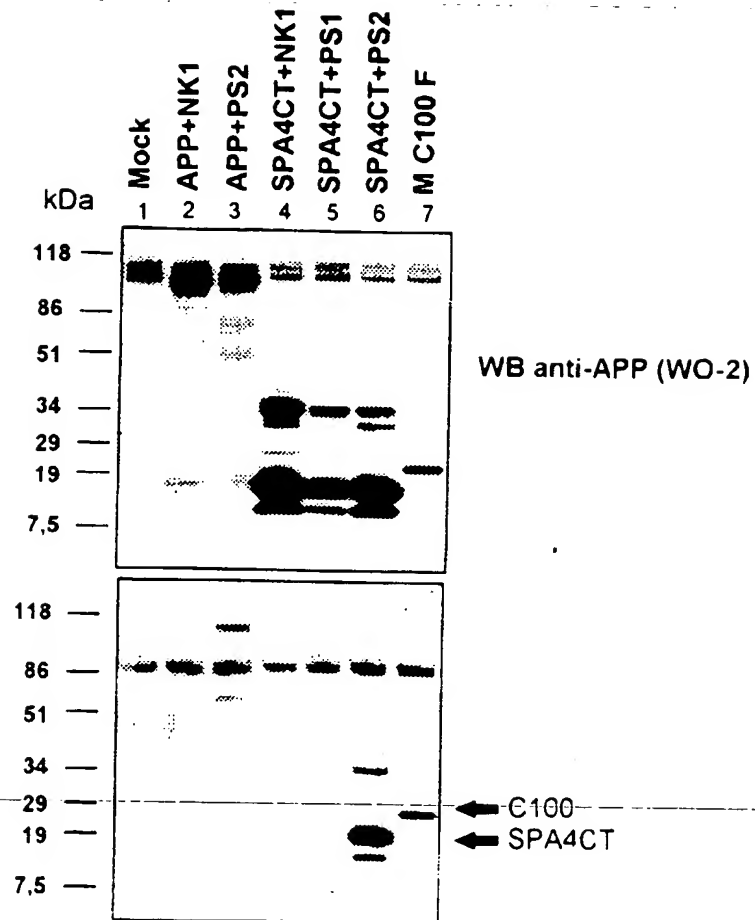


figure 4B

8/16

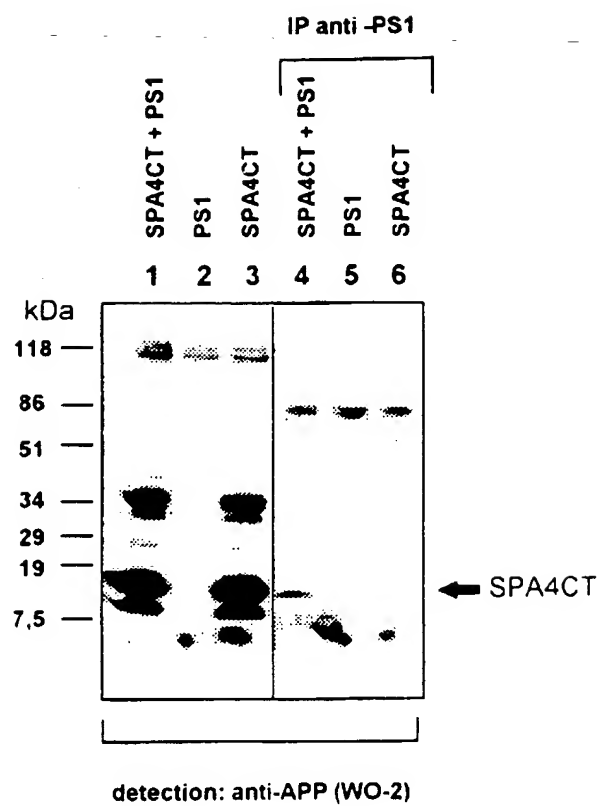


figure 5A

9/16

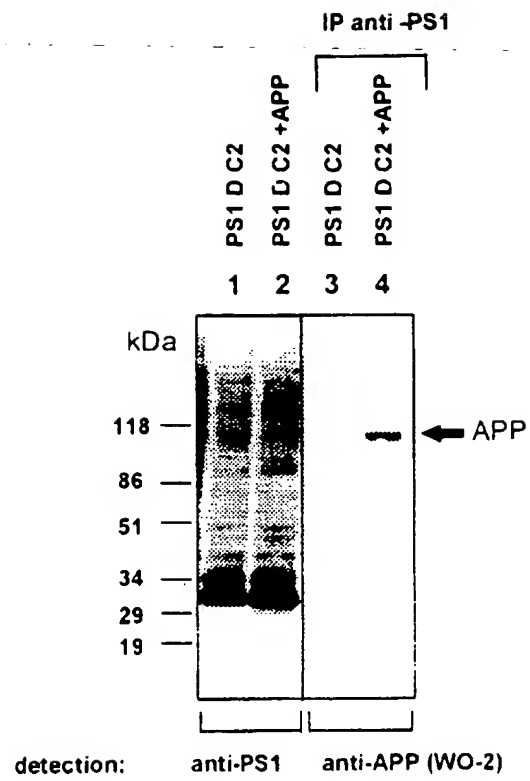


figure 5B

10/16

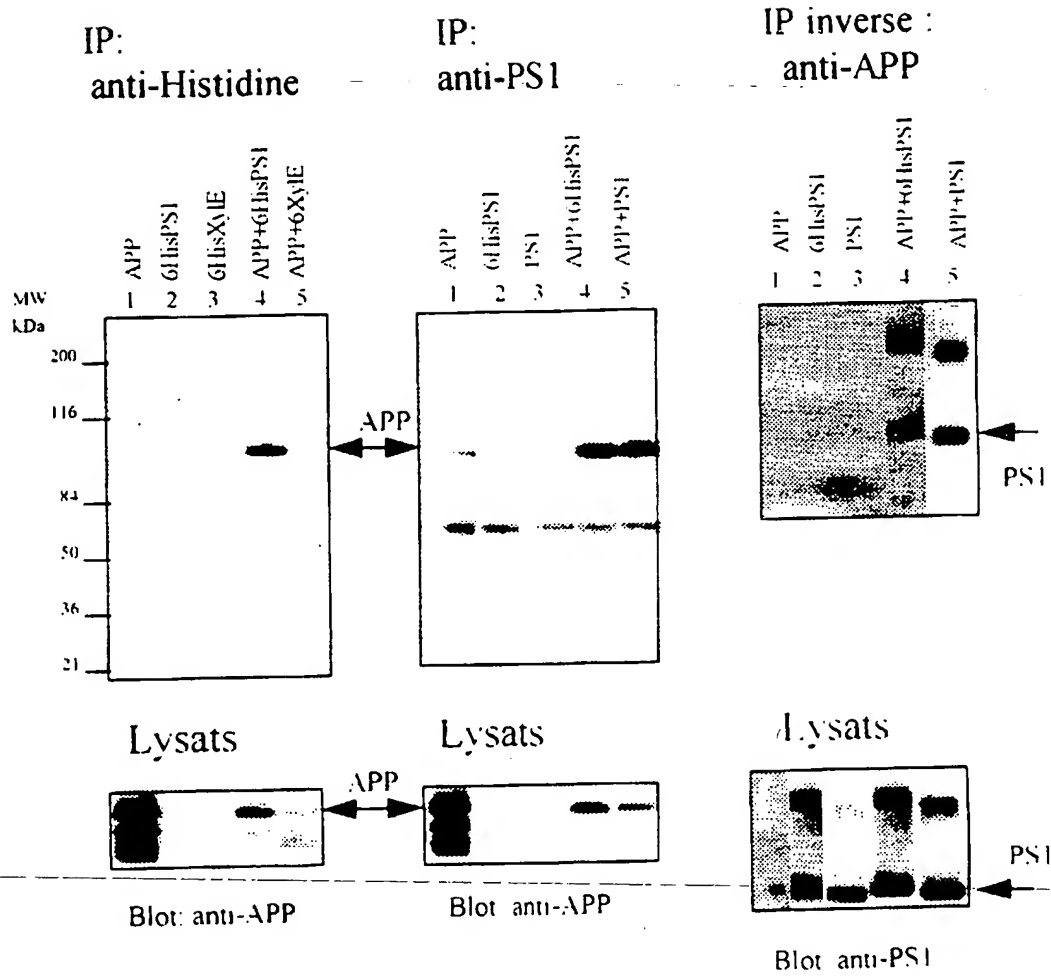


figure 6A

figure 6B

figure 6C

11/16

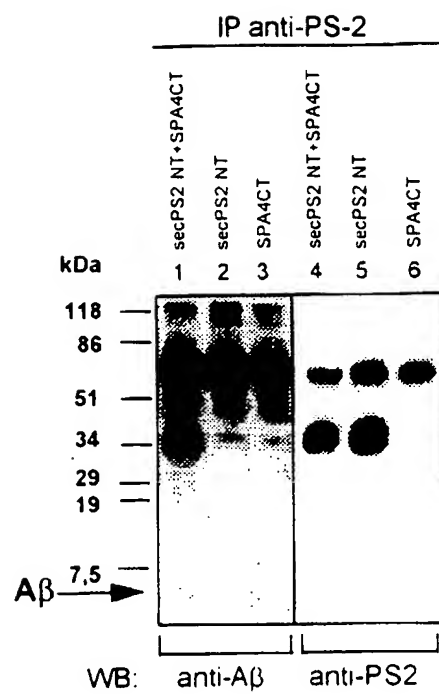


figure 7

12/16

Dose-dépendance en fonction de la concentration de PS2NT

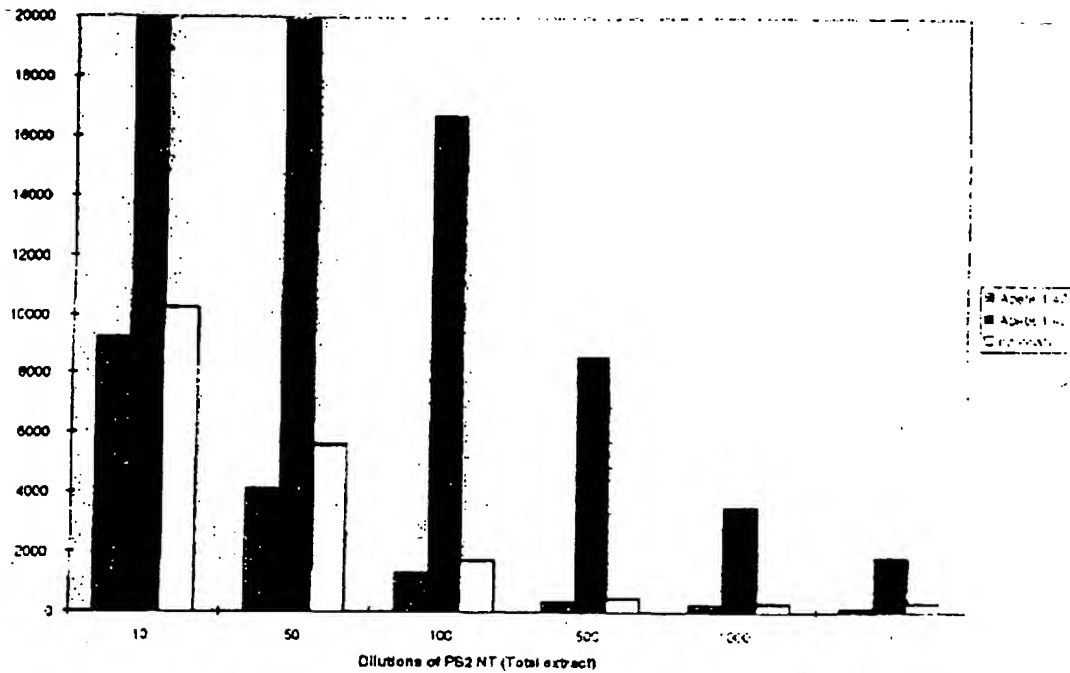


figure 8A

Dose-dépendance en fonction de la concentration de A β

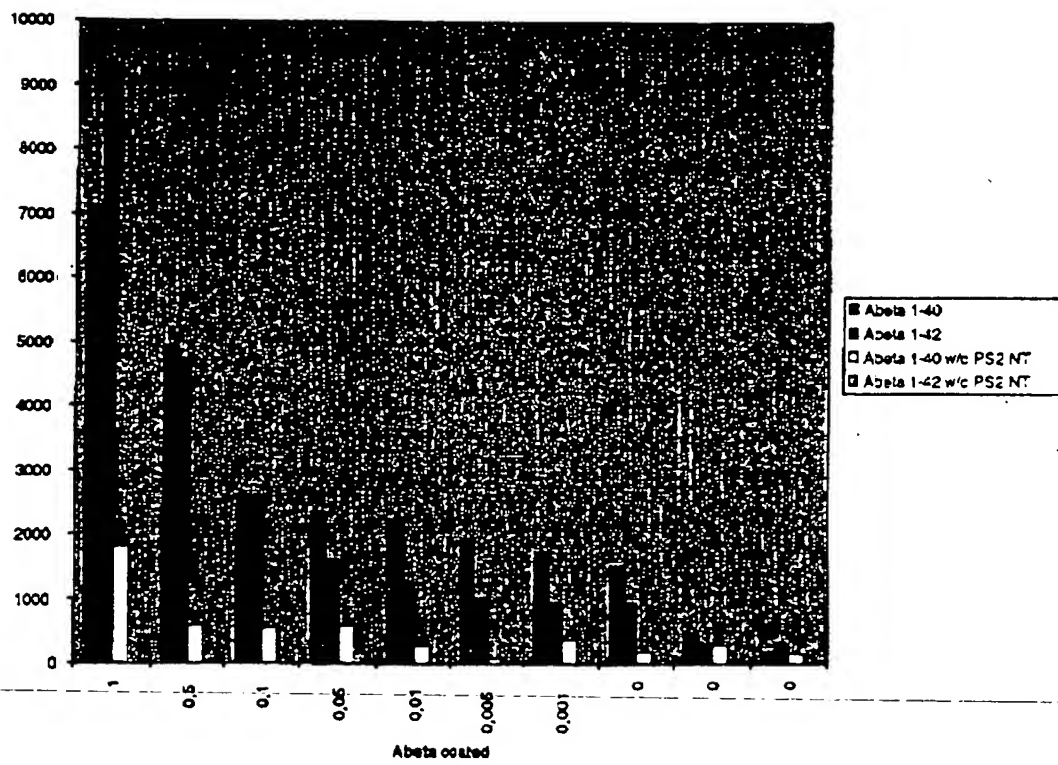


figure 8B

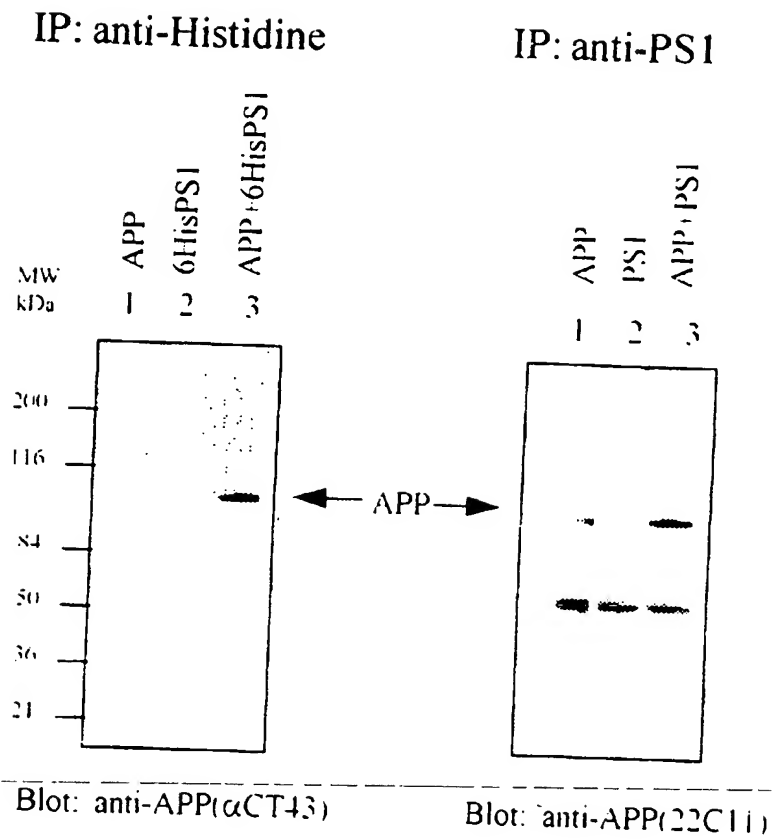


figure 9A

figure 9B

15/16

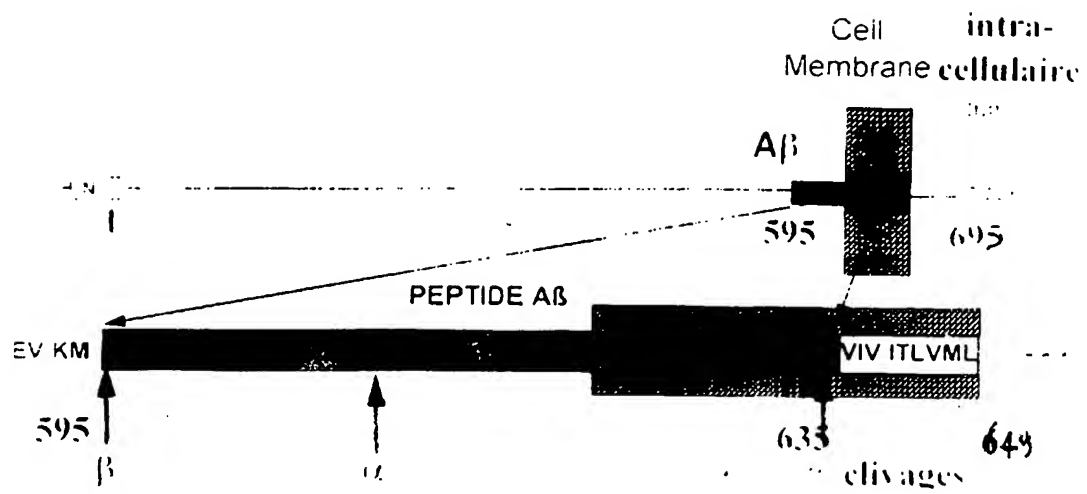


figure 10

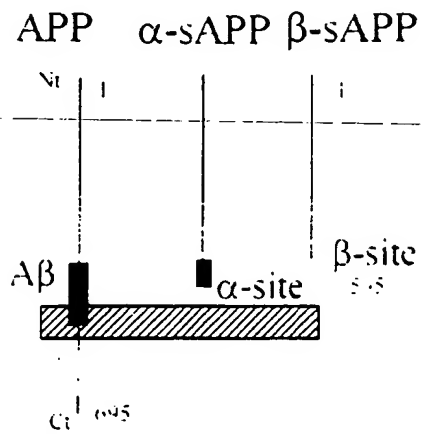
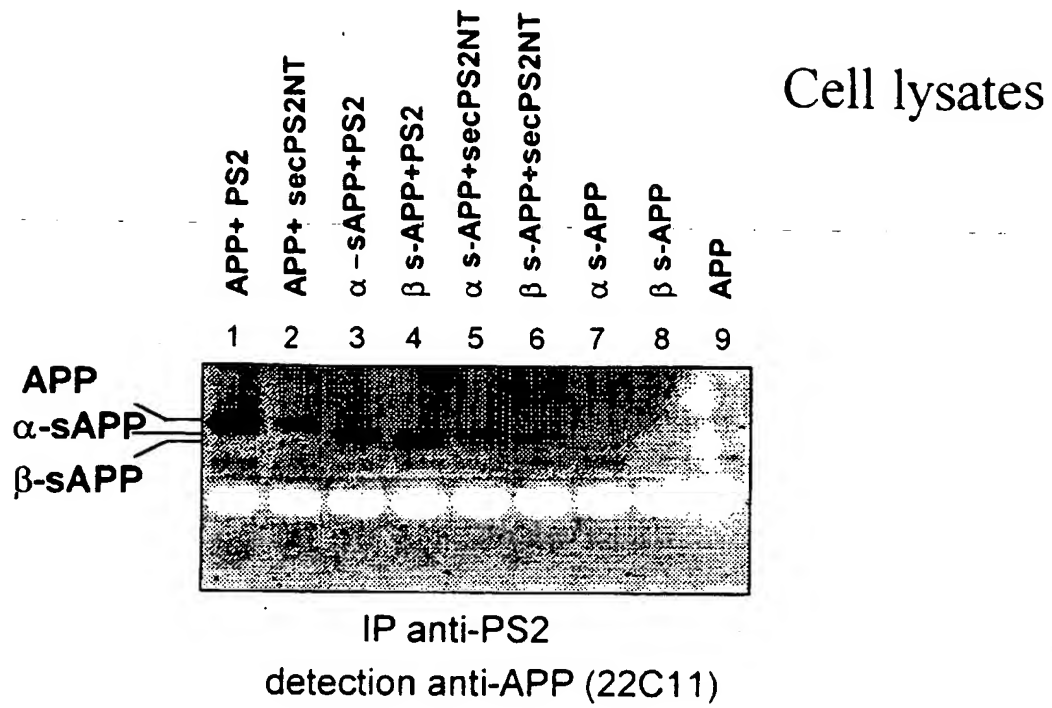


figure 11

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
national

FA 552077

FR 9713384

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,Y	XIA W ET AL: "Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: Implications for the pathogenesis of Alzheimer disease" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 94, juillet 1997, WASHINGTON US, pages 8208-8213, XP002067171 * le document en entier *	1 21,31 2-10, 14-20, 25,27
X A	---	
Y	WO 97 27296 A (HSC RES DEV LP) 31 juillet 1997 * page 56, ligne 10 - page 59, ligne 2 *	1 11,12, 20-25, 29-38
A	---	
A	KIM S S ET AL: "Lack of interactions between amyloid precursor protein and hydrophilic domains of presenilin 1 and 2 using the yeast two hybrid system" JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, vol. 9, no. 1, août 1997, TOTOWA US, pages 49-54, XP002072945 * le document en entier *	1
D,X	WEIDEMANN A ET AL.: "Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and beta amyloid precursor protein" NATURE MEDICINE., vol. 3, no. 3, mars 1997, NEW YORK US, pages 328-332, XP002067172 * le document en entier *	21,31
A	---	
	-/-	1
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 août 1998		De Kok, A
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1500 (03/92) (P04C13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 96 34099 A (HSC RES DEV LP) 31 octobre 1996 * page 3, ligne 21 - page 10, ligne 17 * * page 11, ligne 2 - page 12, ligne 6 * ---	1-7,11, 12, 14-17, 19-38
A	WO 92 13069 A (IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE TECHNOLOGY AND MEDICINE) 6 août 1992 * page 47 - page 48 *	1,8-10, 14,18
T	THINAKARAN G ET AL: "Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP" NEUROBIOLOGY OF DISEASE, vol. 4, no. 6, 1998, NEW YORK US, pages 438-453, XP002072947 * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 août 1998		De Kok, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 (3.92) (P/MC13)